

09/221486

REC'D 10 DEC 1999

PCT/JP99/06336

WIPO

PCT

30.11.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE

JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年11月18日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第328465号

出願人

Applicant(s):

エーザイ株式会社

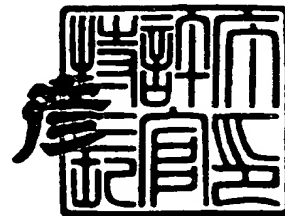
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3078779

【書類名】 特許願

【整理番号】 EP98IM1102

【提出日】 平成10年11月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N30/34

【発明の名称】 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー用の拡散促進装置

【請求項の数】 13

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 9-7-509

 【氏名】 村田 薫

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市松ヶ丘 1-5-3

 【氏名】 真野 成康

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市並木 3-26-13

 【氏名】 浅川 直樹

【特許出願人】

 【識別番号】 000000217

 【郵便番号】 112

 【住所又は居所】 東京都文京区小石川 4丁目 6番 10号

 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

 【代表者】 内藤 晴夫

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 004983

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

特平 10-328465

【物件名】	図面	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー用の拡散促進装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置

【請求項 2】 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に拡散促進装置を連結することによる目的成分の検出感度向上方法

【請求項 3】 溶媒の流入部と流出部の管から構成され、1) 溶媒の流入部又は流出部の管の一部の内径が太くなっていること、又は 2) 溶媒の流入部と流出部の管が一定の角度を有するように配置されること、又は 1) と 2) の両者を有することを特徴とする請求項 1 記載の拡散促進装置

【請求項 4】 溶媒の流入部と流出部の管が成す一定の角度が、鋭角、直角又は鈍角である請求項 3 記載の拡散促進装置

【請求項 5】 溶媒の流入部及び/又は流出部の管内に、フリットを有する請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置

【請求項 6】 フリットが、焼結フィルター、セラミック、金属メッシュ又はセルロース繊維である請求項 5 記載の拡散促進装置

【請求項 7】 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置が、グラジエントミクロ高速液体クロマトグラフィー装置、グラジエントセミミクロ高速液体クロマトグラフィー装置又はグラジエントキャピラリー高速液体クロマトグラフィー装置である請求項 1 記載の拡散促進装置

【請求項 8】 分離用カラムの直前に請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置を設置することを特徴とする低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置

【請求項 9】 成分濃縮用カラムと分離用カラムの間に請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置を連結することを特徴とする低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置

【請求項 10】図 8 中、送液ポンプ（P1）、インジェクター（I）、切替バルブ（V）、成分濃縮用カラム（M）、切替バルブ（V）、溶媒ミキシング装置（MC）及び切替バルブ（V）の順に連結し、別のラインにより送液ポンプ（P2）、切替バルブ（V）、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置（DU）、分離カラム（C）及び検出器（D）を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置

【請求項 11】図 9 中、送液ポンプ（P1）、切替バルブ（V）、溶媒ミキシング装置（MC）及び切替バルブ（V）を連結し、別のラインにより送液ポンプ（P2）、切替バルブ（V）、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置（DU）、分離カラム（C）及び検出器（D）を連結し、更に別のラインにより切替バルブ（V）、成分濃縮用カラム（M）及び切替バルブ（V）を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置

【請求項 12】請求項 10 記載の低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、送液ポンプ（P1）により送られる移動相により目的成分を成分濃縮用カラム（M）に捕捉し、切替バルブを切替えることにより、送液ポンプ（P2）により送られる移動相により、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置（DU）による目的成分の拡散を経由して、分離カラム（C）から目的成分を流出させる検出定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法

【請求項 13】請求項 11 記載の低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、目的成分を成分濃縮用カラム（M）に注入し、この時送液ポンプ（P1）により溶媒ミキシング装置（MC）に溶媒を充填して置き、切替バルブを切替えることにより、ポンプ（P2）により送られる移動相により、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置（DU）による目的成分の拡散を経由して、分離カラム（C）から目的成分を流出させる検出定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分

離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置及び拡散促進装置を連結することによる目的成分の検出感度向上方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

高速液体クロマトグラフィーは、試料中の微量成分の分析に汎用されており、近年では質量分析装置又は核磁気共鳴装置と組み合わせることにより、成分の分離と同定を高感度に行うシステムも用いられている。例えば、特開平3-175355号公報には、高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法と装置及びトラッピングカラムに試料中の目的成分を捕捉する装置が開示されている。

しかし、例えば、高速液体クロマトグラフィー質量分析において、質量分析計における分析精度の観点からは、質量分析計に送液可能な移動相の許容流速は数十 μ l/分である。このような低流速高速液体クロマトグラフィーでは、ラインの管中での目的成分の拡散を抑制する為に、通常よりも内径が小さい管を使用することが多い。一般的には、管の内径は、分離カラムの内径と管内の線速度を考慮して選択されている。

しかし、低流速高速液体クロマトグラフィーにおいて、例えば内径0.1mm以下の管を使用する場合には、管内に微粒子が詰まることがあり、低流速高速液体クロマトグラフィーによる分析は困難であった。

一方、低流速高速液体クロマトグラフィーにおいて、グラジエント溶出を行う場合、即ち、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいては、分離カラムの先端で目的成分が濃縮される効果が得られる場合があることが知られている。例えば、特開平3-175355号公報には、この濃縮効果を効率良く得る為に、分離カラムの直前に、通常よりも太い内径0.8mm×長さ100mmの管を連結することにより、管内でグラジエント効果が生じて目的成分の分離度が向上した例が記載されている。しかし、この手法では、100mmもの長さの管を使用する上に、分離カラムの種類や高速液体クロマトグラフィーの分析条件によっては、必ずしも分離度の向上に結びつかないことが推察される。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、超微量の生体成分又は環境試料・医薬品中の超微量の不純物などを分析評価する際に、その検出定量感度を高めることができる装置の開発が、非常に待ち望まれている。

以上のような状況に鑑み、本発明者らは鋭意検討した結果、以下に示す構成により所期の目的を達成できることを見出し、本発明を完成した。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置である。

また、本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に拡散促進装置を連結することによる目的成分の検出感度向上方法である。

【0005】

拡散促進装置は、溶媒の流入部と流出部の管から構成され、1) 溶媒の流入部又は流出部の管の一部分の内径が太くなっていること、又は2) 溶媒の流入部と流出部の管が一定の角度を有するように配置されること、又は1)と2)の両者を有することを特徴とする装置である。

成分濃縮用カラムを分離カラムの直前に配置した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーシステムにおいて、拡散促進装置は、成分濃縮用カラムと分離カラムの間に管を通じて連結される。拡散促進装置は、成分濃縮用カラムから溶出した目的成分を含む試料バンドを、その装置内で溶媒の流路を変えて拡散させ、均一な溶液を形成する作用を有している。この均一な溶液が、分離カラムへ導入される為、グラジエント溶出における分離カラム先端での濃縮効果が効率よく得られることになる。そして、結果的に、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分の評価に用いられる分離カラムの理論段数の増加と当該ピーク形状の改善が達成され、目的成分の定量検出感度を向上させることが可能となる。

低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、通常に用いられる

配管の内径は0.1 mm以下である。しかし、本発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいては、例えば、その装置内の溶媒の流入部と流出部の管の間の一部分の内径を太く（内径0.13 mm又は0.25 mm）して、他のライン部分の管には内径0.13 mm以下の配管を使用することによって、目的成分の検出感度向上が可能である。また、拡散促進装置の溶媒の流入部と流出部の管の間の内径が太くなっている部分をより長くすることにより、分離カラムに連結された直前の管内及び分離カラム内の目詰まり防止が可能である。

拡散促進装置における溶媒の流入部と流出部の管が成す一定の角度とは、鋭角、直角または鈍角のいずれでも良い。また、拡散促進装置内には、フリット（膜）を入れても良い。フリット（膜）は、例えば、焼結フィルター、セラミック、金属メッシュ又はセルロース繊維などが挙げられるが、もちろん、これらに限定される訳ではない。

特に、拡散促進装置が、溶媒の流入部と流出部の管から構成され、1) 溶媒の流入部又は流出部の管の一部分の内径が太くなっていること、又は2) 溶媒の流入部と流出部の管が一定の角度を有するように配置されること、又は1)と2)の両者を有することを特徴とするものであって、かつ、その流入部及び/又は流出部の管内にフリット（膜）を有する構造である場合には、目的成分の拡散促進と分離カラム内における微粒子の目詰まり防止を同時に効率よく達成することが可能となる。

拡散促進装置は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置であればいずれに組み込んでも検出感度向上機能及び/又は装置内目詰まり防止機能を有している。低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置とは、例えば、内径0.5～1 mmのマイクロカラムを有して数十 μ l/分の流速で使用するグラジエントマイクロ高速液体クロマトグラフィー装置、内径1～2.5 mmのセミマイクロカラムを有して50～250 μ l/分の流速で使用するグラジエントセミマイクロ高速液体クロマトグラフィー装置又は内径0.5 mm以下のキャピラリーカラムを有して数 μ l/分の流速で使用するグラジエントキャピラリー高速液体クロマトグラフィー装置などが挙げられる。

尚、拡散促進装置は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に設置することが望ましく、より好ましくは、成分濃縮用カラムと分離用カラムの間に連結することが望ましい。

【0006】

本発明にかかる拡散促進装置を分離カラムの直前に連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置の一例について、以下に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるわけではない。

【0007】

本発明は、図8中、送液ポンプ(P1)、インジェクター(I)、切替バルブ(V)、成分濃縮用カラム(M)、切替バルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替バルブ(V)の順に連結し、別のラインにより送液ポンプ(P2)、切替バルブ(V)、拡散促進装置(DU)、分離カラム(C)及び検出器(D)を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーである。本発明は、また、上記の低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、送液ポンプ(P1)により送られる移動相により目的成分を成分濃縮用カラム(M)に捕捉し、切替バルブを切替えることにより、送液ポンプ(P2)により送られる移動相により、拡散促進装置(DU)による目的成分の拡散を経由して、分離カラム(C)から目的成分を流出させる検出・定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法である。

【0008】

さらに、本発明は、図9中、送液ポンプ(P1)、切替バルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替バルブ(V)を連結し、別のラインにより送液ポンプ(P2)、切替バルブ(V)、拡散促進装置(DU)、分離カラム(C)及び検出器(D)を連結し、更に別のラインにより切替バルブ(V)、成分濃縮用カラム(M)及び切替バルブ(V)を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーである。本発明は、また、この低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分を成分濃縮用カラム(M)に注入し、この時送液ポンプ(P1)により溶媒ミキシング装置(MC)に溶媒を充填して置き、切替バルブを切替えることにより、ポンプ(P2)により送られ

る移動相により、拡散促進装置（DU）による目的成分の拡散を経由して、分離カラム（C）から目的成分を流出させる検出定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明にかかる拡散促進装置は、溶媒の流入部及び流出部の管を加工して組み合わせたものであり、そのまま使用しても良いが、小型の容器内に設置しても良い。溶媒の流入部及び流出部の管や容器の材質は、特に限定されない。

拡散促進装置用の小型の容器として、例えば、直線型ユニオン、三方型ユニオン又はT字型ユニオンなどが使いやすいが、これらを用いる時は移動相が漏れることを防ぐためにフェラル等を使用して溶媒の流入管及び流出管をしっかりとねじ込むことが望ましい。

【0010】

図1～図7に本発明にかかる拡散促進装置の概念図の一例を示したが、もちろんこれらに限定されるわけではない。

また、図1～図7の拡散促進装置は、溶媒の流入部の管（1）を成分濃縮用カラムに、流出部の管（2）を分離カラムに連結して用いるが、その逆に連結しても良い。即ち、管（1）を分離カラムに、管（2）を成分濃縮用カラムに連結して使用しても良好な拡散促進効果が得られる。

図1は、溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）の一部分（3）の内径が太くなっているものであり、例えば直線型ユニオンを使用した例であり、図2は、図1の装置内の内径が太くなっている部分（3）の一部にフリット（4）を入れた拡散促進装置である。

図3は、図1と同様のメカニズムの拡散促進装置であり、溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）の一部分（3）の内径が太くなっているものであり、図4は、図3の装置内の内径の太くなっている部分（3）にフリット（4）を入れた拡散促進装置である。また、図3及び図4に示すように、拡散促進装置内部の移動相の流路は、流入部の管（1）から流出部の管（2）に向かって、又は流出部の管（2）から流入部の管（1）に向かってテーパ状に広がっていることは好

ましい一例である。これは、拡散装置内における試料の拡散を容易にするためである。

図5～図7は、溶媒の流入部の管(1)と流出部の管(2)が一定の角度を有するように配置された拡散促進装置であり、例えば、図5及び図7では三方型ユニオンを、図6ではT字型ユニオンを使用した例である。流入部の管(1)と流出部の管(2)が形成する角度が、図5では鋭角、図6では直角、図7では鈍角である。いずれも、両方の管の交差部分(5)で溶媒の流路が変化させ、試料バンドの拡散を生じさせる機能を有しているものである。また、図5に示すように、装置内の管の一部分にラインフィルター等のフリット(4)を入れても良い。

【0011】

本発明における拡散促進装置は、以下のように構成された低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィー内に配置することにより、微量成分の高速・高感度分析に適した検出感度向上機能を有するシステムとなる。

本システムを図8より詳細に説明する。

図8は低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィーの模式図であり、送液ポンプ(P1)、インジェクター(I)、切替バルブ(V)、拡散膜及び吸着膜からなる成分濃縮用カラム(M)、切替バルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替バルブ(V)が順に連結され、別に送液ポンプ(P2)、切替バルブ(V)、拡散促進装置(DU)、分離カラム(C)及び検出器(D)が連結されている。この低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィー・システムにおける成分の濃縮・分離方法は次のようである。

【0012】

(A) 送液ポンプ(P1)から成分濃縮用移動相を送出し、インジェクター(I)から試料溶液を注入し、成分濃縮用移動相で試料溶液を希釈しながら成分濃縮用カラム(M)へ試料を送液して試料中の目的成分を成分濃縮用カラム(M)に捕捉させる。同時に成分濃縮用移動相で、溶媒ミキシング装置を満たす。成分濃縮用移動相とは、成分濃縮カラムに目的成分を吸着させるための移動相であり、成分濃縮カラムが疎水的性質を有する場合には、水等の比較的極性の大きな溶媒である。

【0013】

(B) 次に、送液ポンプ (P2) から送出される試料分離用移動相をバルブ (V) を切替えて溶媒ミキシング装置 (MC)、成分濃縮用カラム (M)、拡散促進装置 (DU)、分離用カラム (C) および検出器 (D) を経て排出させる。試料分離用移動相とは、成分濃縮用カラム (M) から試料成分を離脱させ、さらに分離用カラム (C) において試料成分を分離するための移動相であり、成分濃縮用カラム (M) が疎水的性質を有する場合は、例えばメタノール、アセトニトリル等の、成分濃縮用移動相より極性の小さな溶媒である。この時、成分濃縮用移動相と試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置 (MC) にて混合し、両者の移動相の混合にグラディエントを形成させながら成分濃縮用カラム (M) に送液し、捕捉した試料中の目的成分を脱離させる。そして、拡散促進装置 (DU) 内において、溶媒の流路を変え目的成分を含む試料バンドを拡散させ、均一な溶液を形成させる。この均一な溶液が、分離カラムへ導入される為、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分の評価に用いられる分離カラムの理論段数の上昇と当該ピーク形状の改善が達成される。

即ち、分離カラムにおける目的成分の定量検出感度が著しく向上するが、これが本システムの特徴の一つである。

【0014】

ここでポンプとは高速液体クロマトグラフィー用の送液ポンプであり、好ましくは、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー用の送液ポンプである。また、バルブとは高速液体クロマトグラフィー用の十方バルブ、六方バルブ等である。インジェクターとは高速液体クロマトグラフィー中に試料溶液を注入するための装置であり、分離カラムとは試料中の目的成分を分離するためのカラムであり、目的に応じていわゆる順相カラム、逆相カラム等を適宜選択できる。これら装置は市販のものを使用することができる。

【0015】

本発明にかかる低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーの別のシステムを図9により説明する。図9は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーの模式図であり、送液ポンプ (P1)、切替えバルブ (V)、溶媒ミキシン

グ装置 (MC) 及び切替えバルブ (V) が順に連結され、別に送液ポンプ (P 2)、切替えバルブ (V)、拡散促進装置 (DU)、分離カラム (C) 及び検出器が連結され、更に別のラインにより切替えバルブ (V)、成分濃縮用カラム (M) 及び切替えバルブ (V) が連結されている。

【0016】

図9に示すシステムにおける成分の濃縮・分離方法は次のようである。

(A) 移動相1が送液ポンプ (P 1) から送出され、溶媒ミキシング装置 (MC) を満たす。切替えバルブ (V) に装着された成分濃縮用カラムに、切替えバルブのインジェクションポートから試料溶液を注入し、試料中の目的成分を上記成分濃縮用カラムに捕捉させた後、更に適当な溶媒で目的成分を膜から脱離させないようにして洗浄する。

(B) 次に、切替えバルブ (V) を切替えてポンプ (P 2) から試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置 (MC)、成分濃縮用カラム、分離用カラム (C) 及び検出器 (D) へと送液する。この時、移動相1と試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置 (MC) 中で混合し、両者の混合にグラディエントを形成させながら、成分濃縮用カラムに送液し、捕捉した試料中の目的成分を脱離させ、拡散促進装置 (DU) 内で溶媒の流路を変え目的成分を含む試料バンドを拡散させ、均一な溶液を形成させる。これを分離用カラム (C) に流入させて目的成分を分離する。この時、成分濃縮用カラムを通過する試料分離用移動相の流路は、試料溶液を注入した方向と反対方向である。また、図9に示すシステムでは、試料溶液を成分濃縮用カラムに手動で注入することが可能であり、試料溶液の大量処理、成分の高速濃縮を可能とするものである。

【0017】

【発明の効果】

本発明によると、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に拡散促進装置を連結することにより、目的成分の検出感度向上が可能となる。

【0018】

実験例

低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分のピーク高さと理論段数に及ぼす拡散促進装置の形状の影響

図 8 に示した低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置を用い、拡散促進装置として図 1、図 2、図 5、図 6 又は図 7 に示す装置を各々連結して、目的成分の評価を行った。評価項目は、拡散促進装置の形状が目的成分のピーク高さと理論段数であり、拡散促進装置の形状が両ファクターに及ぼす影響について検討を行った。

一般に、混合物の各成分を分析する時に、目的成分のピーク幅が広がって隣接ピークと重なりあうと分離が不完全になる。したがって、ピーク幅が広がらないような実験条件を求める必要があり、通常はこのピーク幅の広がりの評価の尺度として理論段数 (N) が用いられる。また、理論段数 (N) は、 $(4VR/W)^2$ で表される。ここで、VR = 目的成分の保持時間、W = 目的成分のピーク幅である。

尚、対照として、拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーを用いた評価も行った。

実験結果のまとめを、表 1 に示した。

【0019】

【表 1】

拡散促進装置の形状によるピーク高さと理論段数

拡散促進装置の形状	ピーク高さ	理論段数 (N)
装置なし	83640	38612
直線型ユニオン (フリットなし)	136915	-
直線型ユニオン (フリットあり)	128862	71728
鋭角の流路	125570	-
直角の流路	108062	66915
鈍角の流路	122534	-

また、図 10～図 15 には、種々の形状の拡散促進装置を低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーに連結した時に得られた個別のクロマトグラムを示した。即ち、図 10、図 11、図 12、図 13、図 14、図 15 は、各々、拡散

促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 1 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 2 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 5 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 6 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 7 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーと比較して、目的成分のピーク高さと分離カラムの理論段数の明らかな増加が認められた。また、拡散促進装置の形状による両ファクターに及ぼす差はほとんど認められなかった。

尚、図 11、図 13、図 15 に示すように、拡散促進装置の使用により目的成分のピークがより一層シャープになりチャート紙上で振り切れてしまう例では、理論段数の算出はできなかった。

さらに、拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいては、分離カラム直前の管及び分離カラムの目詰まりは認めなかった。

以上から、分離用カラムの直前に連結される本発明にかかる拡散促進装置は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、顕著な検出感度向上機能を有することは明らかである。

【0020】

表 1 の実験データ及び図 10～図 15 のクロマトグラムは、以下の分析条件により得られたものである。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：254 nm）

分離用カラム：Inertsil ODS-2(0.7mm I.D.×150mm)

濃縮用移動相：0.1%酢酸アンモニウム水溶液

試料分離用移動相：0.1%酢酸アンモニウム含有アセトニトリル・エタノール

混液（500：500）

流量：濃縮用移動相： 1.0ml/min

試料分離用移動相： 0.025ml/min

試料成分は、安息香酸 n-プロピル、安息香酸ベンジル、安息香酸 n-ブチル及び安息香酸 n-ヘキシルをそれぞれ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 10% アセトニトリル水溶液に溶解した。試料の注入量は、 $10 \mu\text{L}$ である。

【0021】

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】

溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）から構成され、その一部分（3）の内径が太くなっている形状を有する拡散促進装置の模式図である。

【0016】

【図2】

溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）から構成され、その一部分（3）の内径が太くなっている形状を有し、その部分にフリット（4）を入れた拡散促進装置の模式図である。

【0016】

【図3】

溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）から構成され、その一部分（3）の内径が太くなっている形状を有し、内径の太い一部分がテーパ状に広がっている拡散促進装置の模式図である。

【0016】

【図4】

溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）から構成され、その一部分（3）の内径が太くなっている形状を有し、内径の太い一部分（3）がテーパ状に広がっていて、そこにフリット（4）を入れた拡散促進装置の模式図である。

【0016】

【図5】

溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）が鋭角を成すように配置された拡

散促進装置の模式図である。

【0016】

【図6】

溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）が直角を成すように配置された拡散促進装置の模式図である。

【0016】

【図7】

溶媒の流入部の管（1）と流出部の管（2）が鈍角を成すように配置された拡散促進装置の模式図である。

【0016】

【図8】

分離用カラムの直前に拡散促進装置が連結された低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置の模式図である。

【0016】

【図9】

分離用カラムの直前に拡散促進装置が連結された低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置の模式図である。

【0016】

【図10】

拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

【0016】

【図11】

図1に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

【0016】

【図12】

図2に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

【0016】

【図13】

図5示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

【0016】

【図14】

図6に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

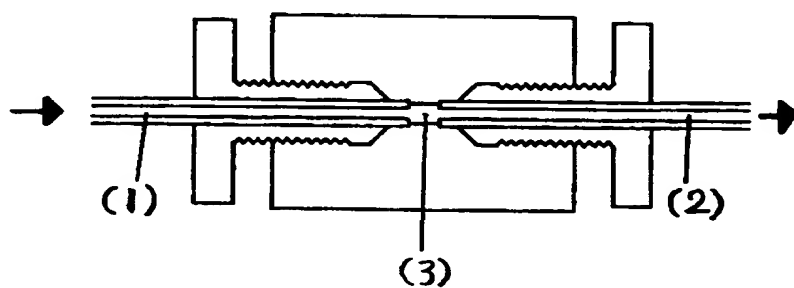
【0016】

【図15】

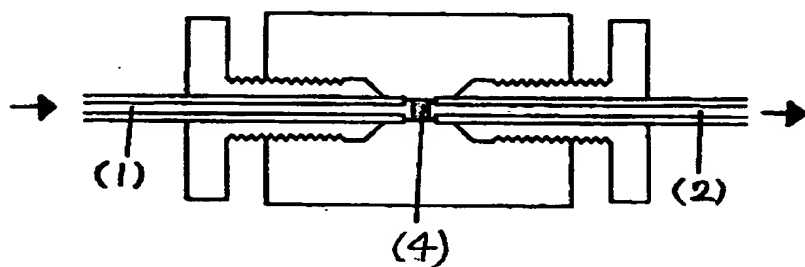
図7に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

【書類名】 図面

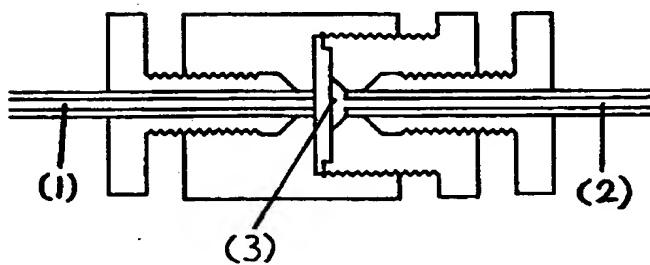
【図 1】



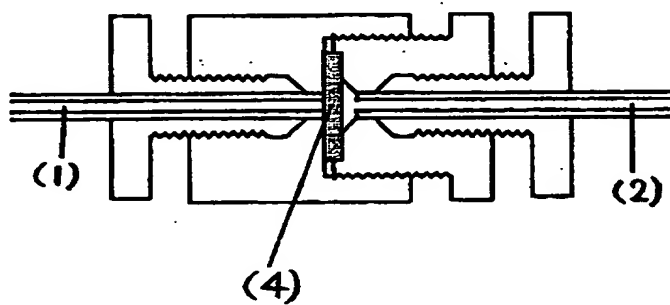
【図 2】



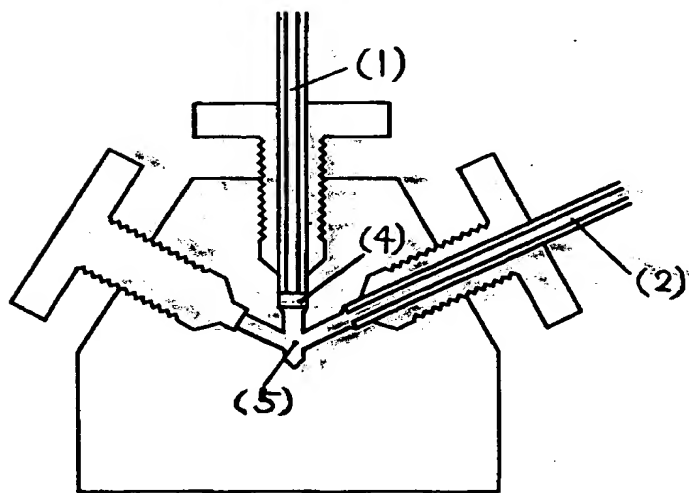
【図 3】



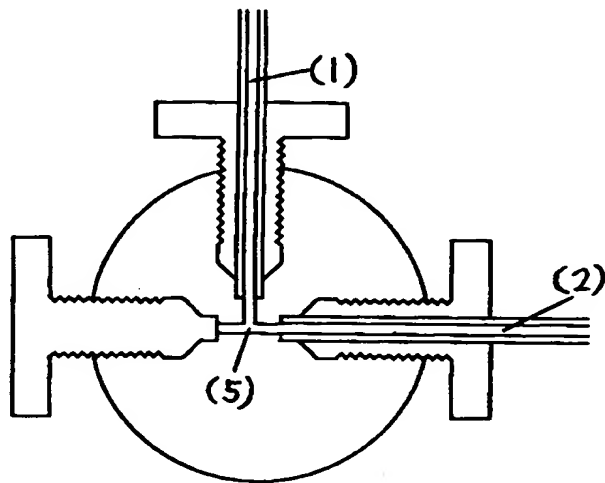
【図4】



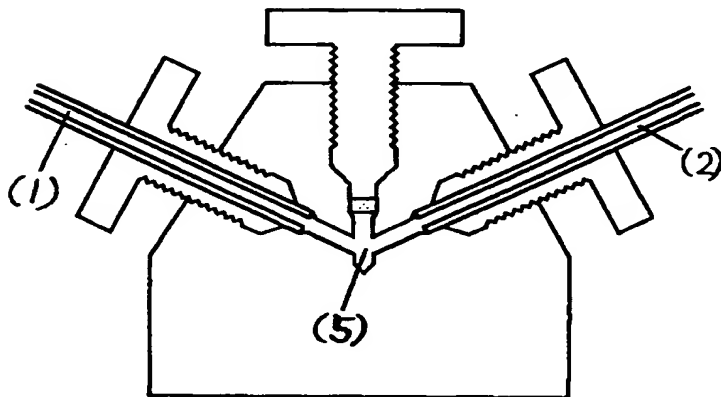
【図5】



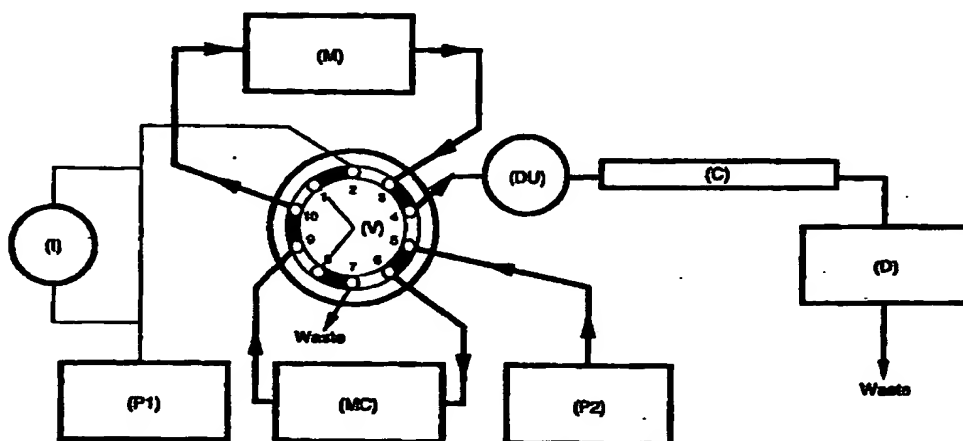
【図6】



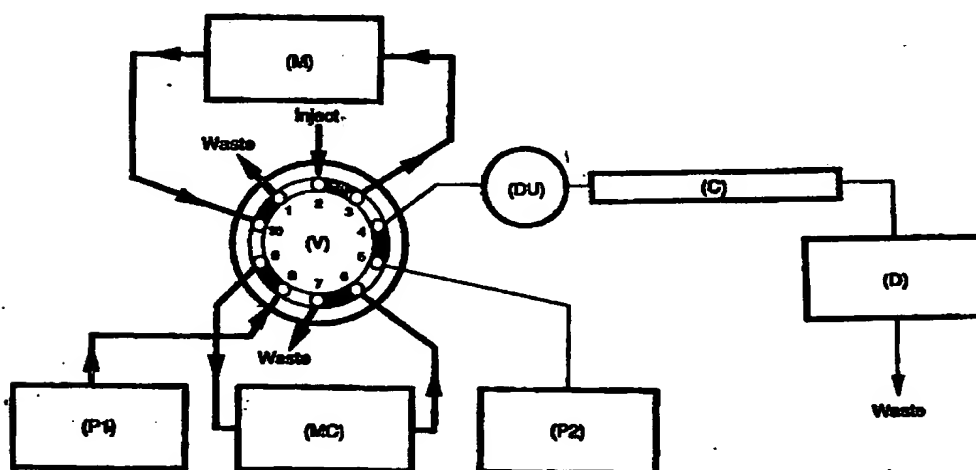
【図7】



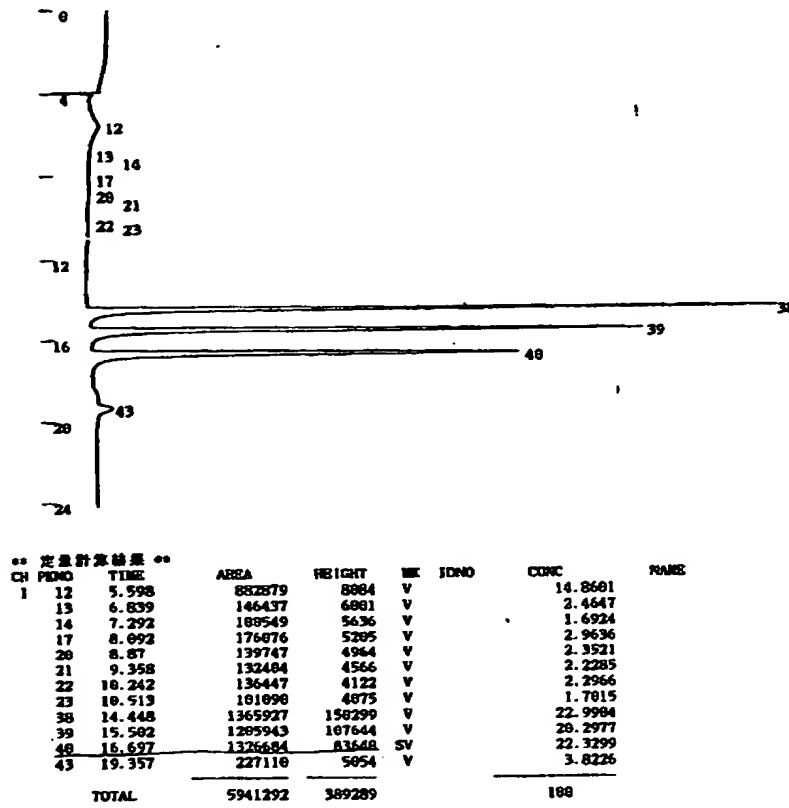
【图 8】



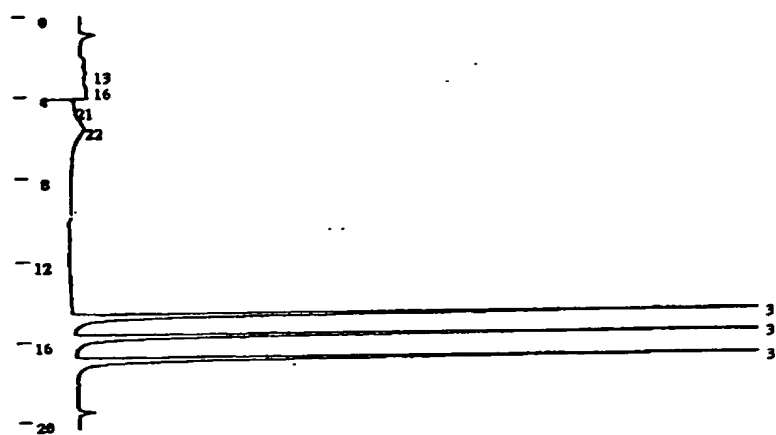
【图9】



【図 10】



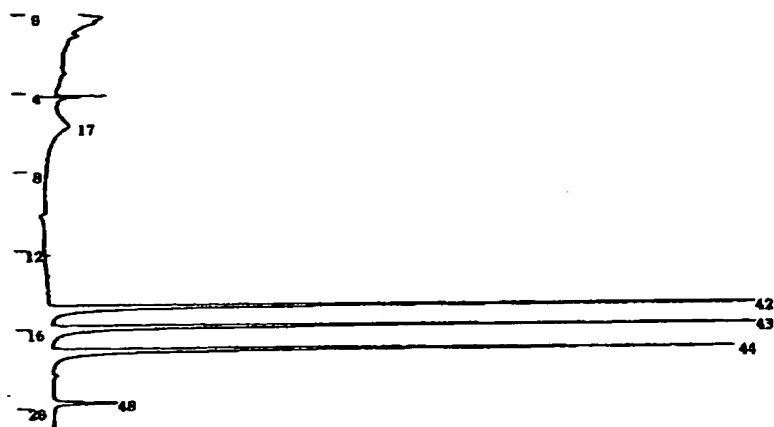
【図 1 1】



== 定量計算結果 ==

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	13	2.84	127448	4270	V		2.8819	
	16	3.644	133146	4936	V		2.9274	
	21	4.717	134461	5594	V		2.9563	
	22	5.609	653562	6367	V		14.3694	
	35	14.704	1309387	173466	V		28.7885	
	36	15.753	1088416	138776	V		23.9382	
	37	16.9	1101898	136915	SV		24.2264	
	TOTAL		4548382	472323			100	

【図 1 2】



== 定量計算結果 ==

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	17	5.702	140987	2897			3.8584	
	42	14.886	1239519	165528	V		34.6892	
	43	15.917	1056595	138924	V		28.9984	
	44	17.058	1021066	128862	SV		29.0362	
	48	19.71	116478	12346	V		3.1959	

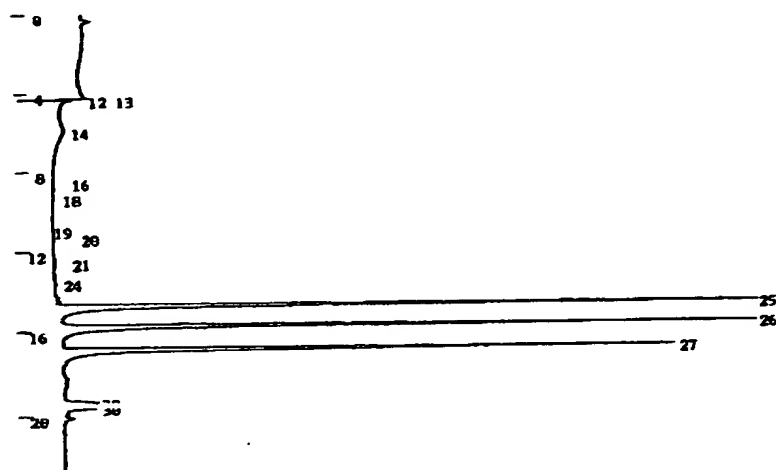
【図 13】



== 定量計算結果 ==

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	EX	TONO	CONC	NAME
1	14	3.558	213858	5413	V		3.6756	
	15	4.17	180383	8758	VE		3.1883	
	17	5.314	642157	8952	V		11.8372	
	18	6.03	211628	6787	V		3.6374	
	19	6.611	548946	6713	V		9.2976	
	20	8.175	187671	3629	V		3.2256	
	21	9.875	176629	2987	V		3.8255	
	22	11.042	138132	2858	V		2.3742	
	24	12.466	129777	2374	V		2.2385	
	28	14.69	1387854	161172	V		22.4652	
	29	15.753	1067624	135933	V		18.3499	
	30	16.981	1822883	125578	SV		17.581	
	TOTAL		5818139	469349			100	

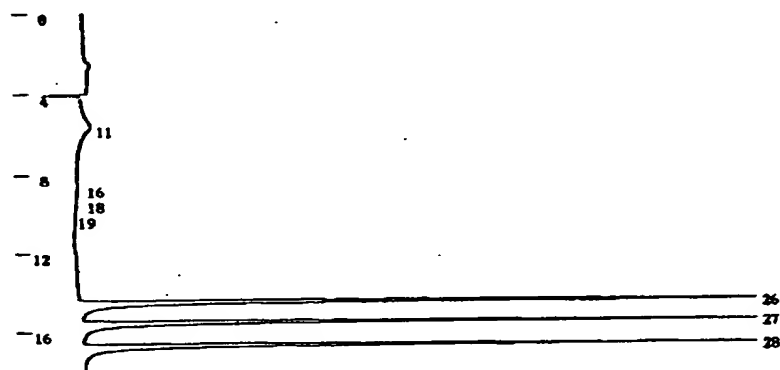
【図 14】



== 定量計算結果 ==

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	SK	IDNO	CONC	NAME
1	12	4.212	216254	10790	VE		3.4498	
	13	4.371	374486	9812	E		5.9741	
	14	5.872	1067523	7555	V		17.6295	
	16	8.484	122851	4448	V		1.9598	
	18	9.265	230590	4102	V		3.6784	
	19	10.925	177357	3365	V		2.8293	
	20	11.26	162388	3246	V		2.5903	
	21	12.417	125681	2969	V		2.0836	
	24	13.595	106976	2509	V		1.7865	
	25	14.733	1309167	143544	V		20.8842	
	26	15.769	1132924	128244	V		18.0727	
	27	16.925	1094026	108862	V		17.4522	

【図 15】



== 定量計算結果 ==

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	PK	IDNO	CONC	NAME
1	11	5.657	894647	6789	V		19.3899	
	16	8.708	118396	3061	V		2.5648	
	18	9.575	102426	2517	V		2.2189	
	19	10.400	100793	1864	V		2.3566	
	26	14.522	1284395	161898	V		27.8241	
	27	15.566	1056711	137816	V		22.8917	
	28	16.744	1050760	122534	SV		22.7628	
TOTAL			4616126	436388			100	

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、検出感度向上の為の装置及び方法を提供する。

【解決手段】本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置である。

【選択図】 なし

【書類名】	職権訂正データ
【訂正書類】	特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000000217
【住所又は居所】	東京都文京区小石川4丁目6番10号
【氏名又は名称】	エーザイ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000217]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名 エーザイ株式会社